

DE 197 26 253

File 351:Derwent WPI 1963-2001/UD,UM &UP=200117  
(c) 2001 DERWENT INFO LTD

?s pn=de 19726253

S1 1 PN=DE 19726253

?t s1/23/1

1/23/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI  
(c) 2001 DERWENT INFO LTD. All rts. reserv.

012255505

WPI Acc No: 1999-061611/199906

XRAM Acc No: C99-018514

Treatment of glomerulonephritis without side effects - using proteolytic enzyme(s), especially trypsin, bromelain and/or papain, optionally in combination with rutoside

Patent Assignee: MUCOS PHARMA GMBH & CO (MUCO-N)

Number of Countries: 020 Number of Patents: 004

Abstract (Basic): DE 19726253 A

Use of at least one proteolytic enzyme and optionally rutoside, for treating glomerulonephritis, is new.

USE - The proteolytic enzymes may act by breaking up deposits of immune complexes in tissue affected by glomerulonephritis. They may also act by effecting altered cellular expression of cytokines, cytokine receptors, endogenous tissue metalloproteases or cellular adhesion molecules. Alternatively they may act by effecting reductions in the amount of hyperactive T-cells.

ADVANTAGE - No damaging side effects are observed, even with use of the enzymes (or combination of enzymes) over a long period of time.

Dwg.0/5

Title Terms: TREAT; GLOMERULONEPHRITIS; SIDE; EFFECT; PROTEOLYTIC; ENZYME;  
TRYPSIN; BROMELAIN; PAPAIN; OPTION; COMBINATION

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): A61K-038/48

International Patent Class (Additional): A61K-031/70



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ Off nl gungsschrift  
⑩ DE 197 26 253 A 1

⑤ Int. Cl.<sup>6</sup>  
A 61 K 38/48  
A 61 K 31/70

⑳ Aktenzeichen: 197 26 253.8  
㉔ Anmeldetag: 20. 6. 97  
㉕ Offenlegungstag: 24. 12. 98

DE 197 26 253 A 1

㉑ Anmelder:  
Mucos Pharma GmbH & Co, 82538 Geretsried, DE

㉒ Vertreter:  
Grünecker, Kinkeldey, Stockmair & Schwanhäusser,  
Anwaltssozietät, 80538 München

㉓ Erfinder:  
Ransberger, Karl, 82402 Seeshaupt, DE; Stauder,  
Gerhard, Dr., 82538 Geretsried, DE

㉔ Entgegenhaltungen:  
DE 43 02 060 A1  
DE 41 30 221 A1  
DD 2 02 804

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

㉕ Verwendung von mindestens einem proteolytischen Enzym zur Behandlung von Glomerulonephritis

㉖ Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von mindestens einem proteolytischen Enzym und gegebenenfalls Rutosid zur Behandlung von Glomerulonephritis. Als proteolytisches Enzym wird bevorzugt Trypsin, Bromelain oder Papain oder eine Kombination derselben eingesetzt.

DE 197 26 253 A 1

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von mindestens einem proteolytischen Enzym und gegebenenfalls Rutin zur Behandlung von Glomerulonephritis. Als proteolytisches Enzym wird bevorzugt Trypsin, Bromelain oder Papain oder eine Kombination derselben eingesetzt.

Glomerulonephritis ist ein Sammelbegriff für sehr verschiedenartige, bakterielle, Nierenerkrankungen mit Entzündungsvorgängen in den Nierenkörperchen und sekundär in anderen Teilen der Nephrene und des Interstitiums. Während einer Glomerulonephritis kann es zur Einlagerung von Immunkomplexablagerungen innerhalb der Gewebe kommen. Experimentelle Modelle der membranösen Glomerulonephritis können eine schwere Proteinurie, oft begleitet von einem nephrotischen Syndrom, auslösen. Häufig kommt es bei der Serum-Nephritis und der autologen Phase der Heymann Nephritis auch zu einer Hypercholesterolämie. Eine Form der aktiven Serum-Nephritis, die durch Immunisierung von Mäusen mit Dextranen induziert wird, löst eine spontane IgA-Nephropathie bei Patienten aus. Daraufhin akkumulieren sich überzählige, mesangiale Ablagerungen und einige kapilläre Ablagerungen, hauptsächlich mit IgA, in den Glomeruli. Es tritt außerdem eine signifikante Hämaturie und manchmal eine Proteinurie auf.

Da die Glomerulonephritis also mit einer Vielzahl ernster Probleme für den Körper einhergeht und eine Therapie in einigen Fällen schwierig ist, werden Anstrengungen in vielen Richtungen unternommen, um die Krankheit zu heilen oder doch zumindest ihre Symptome und Beschwerden zu verringern.

Neben einer Antibiotikatherapie wird daher ein verstärktes Augenmerk auf unterstützende Mittel gerichtet, die die Behandlung ergänzen oder verstärken.

Die Behandlung verschiedener Krankheitszustände mit Proteinasen ist seit einiger Zeit bekannt. Solche Proteinasen sind z. B. Papain, Trypsin und Bromelain. Ohne an eine Theorie gebunden zu sein, wird angenommen, daß die Wirkung von Proteinasen in der Regel auf einem Eingriff in das Immunsystem beruht.

Der vorliegenden Erfindung lag das technische Problem zugrunde, ein weiteres Medikament zur Behandlung von Glomerulonephritis zur Verfügung zu stellen. Dieses Problem wird erfindungsgemäß gelöst durch die in Anspruch 1 angegebene Erfindung. Die Unteransprüche betreffen bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung.

Überraschend wurde gefunden, daß Proteinasen, gegebenenfalls in Kombination mit Rutin auch bei einer Krankheit wie der Glomerulonephritis wirken.

Gemäß Anspruch 1 der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von mindestens einem proteolytischen Enzym und gegebenenfalls Rutin zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Glomerulonephritis vorgesehen.

Es wird angenommen, daß die enzymatische Auflösung der glomerulären Immunablagerungen dem therapeutischen Effekt zugrunde liegen, obwohl andere Mechanismen, wie z. B. eine veränderte zelluläre Expression von Cytokinen und Cytokinrezeptoren, von endogenen Gewebemetalloproteasen und zellulären Adhäsionsmolekülen ebenfalls potentielle Ziele der Proteasen sind, wie auch eine Reduktion der hyperaktiven T-Zellen.

Vorzugsweise wird als proteolytisches Enzym Trypsin, Bromelain oder Papain verwendet oder eine Kombination von einem oder mehreren dieser Enzyme.

Die erfindungsgemäß verwendeten Enzyme lassen sich kostengünstig aus den folgenden Rohmaterialien isolieren.

Bromelain ist ein proteolytisches wirksames Enzym aus dem Preßsaft der Ananas und kann auch noch aus reifen Früchten isoliert werden.

Papain ist ein proteolytisches Enzym, das aus dem Milchsafte der unreifen, fleischigen Früchte des Melonenbaums *Carica Papaya* gewonnen wird. Reines Papain ist ein kristallines Polypeptid mit einem MG. von 23350, das aus einer Kette von 212 Aminosäureresten mit 4 Disulfid-Brücken besteht; die Sequenz und Raumstruktur sind bekannt. Papain wird vielfältig eingesetzt: Aufgrund seiner Protein-spaltenden Eigenschaft als "Fleischzartmacher" oder "Mürbesalz", zum Klären von Bier, zur Brot- und Hartkeksherstellung, in der Lederzubereitung, in der Textil-Industrie zum Entbasten von Seide und zur Verhinderung von Wollverfilzung, in der Tabak-Industrie zur Qualitätsverbesserung, zur Rückgewinnung von Silber aus verbrauchtem photographischem Material, ferner in der Bakteriologie zur Pepton-Gewinnung. In der Medizin dient Papain bereits zur Unterstützung der enzymatischen Verdauung, zur enzymatischen Wundreinigung und als Zusatz zu Zahnprothese-Reinigungsmitteln. Für Spezialzwecke werden Papain-Präparate auch an Kunststoffpolymere oder an Agaroträger gebunden angeboten. Papain ist auch als Katalysator zur Synthese von Oligopeptiden verwendet worden.

Trypsin ist ein proteolytisches Enzym, das ebenfalls im Pankreas gebildet wird und in Verbindung mit anderen Enzymen bereits therapeutisch eingesetzt wird. Es gehört zu den Serin-Proteinasen. Kristallines Trypsin hat ein MG. von ca. 23300, ist in Wasser, nicht aber in Alkohol löslich, besitzt ein Wirkungsoptimum bei pH 7-9 und spaltet Peptid-Ketten spezifisch Carboxy-seitig der basischen Aminosäurereste L-Lysin und L-Arginin. Die räumliche Struktur des aus 223 Aminosäuren bestehenden Trypsins ist bekannt.

Weiterhin kann zusätzlich Rutosid dem Medikament beigemischt werden. Rutosid, auch als Rutin bekannt, ist ein Glycosid, das zu den Flavonoiden gehört.

Eine besonders gute Wirksamkeit zeigt sich bei der Verwendung einer Kombination der Enzyme Bromelain, Papain und/oder Trypsin. Neben der bemerkenswerten und unerwarteten Wirkung dieser Enzyme auf die Verbesserung eines Glomerulonephritis-Krankheitszustandes hat die kombinierte Verwendung der genannten Enzyme weiterhin den Vorteil, daß auch bei einer Langzeitanwendung keine schädigenden Nebenwirkungen auftreten.

Eine besonders gute Wirksamkeit hat die kombinierte Verwendung von 20 bis 100 mg Bromelain, 40 bis 120 mg Papain und 10 bis 50 mg Trypsin pro Dosisseinheit.

Ganz besonders bevorzugt ist eine Kombination von 90 mg Bromelain, 120 mg Papain und 100 mg Rutosid $\times$ 3H<sub>2</sub>O.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird eine Kombination von 48 mg Trypsin, 90 mg Bromelain und 100 mg Rutosid $\times$ 3H<sub>2</sub>O verwendet.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden 10 bis 100 mg, besonders bevorzugt 100 mg Rutosid $\times$ 3 H<sub>2</sub>O pro Dosisseinheit verwendet.

Das Medikament kann weiterhin alle üblichen Hilfs- und/oder Trägerstoffe enthalten.

Als Hilfs- und Trägerstoffe kommen z. B. Lactose, Magnesiumstearat, Stearinsäure, Talkum, Methacrylsäure, Copolymerisat Typ A, Shellack, Makrogol 6000, Dibutylphthalat, Vanillin, Titandioxid, weißer Ton, Polyindon, gelbes Wachs und Carnaubawachs in Frage.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung im einzelnen erläutern.

## Beispiel 1

### Material und Methoden

#### 1. Material

Es wurde das Zellkulturmedium RPMI 1640 mit folgenden Zusätzen verwendet:  $\text{NaHCO}_3$  (Biochrom, 2 g/l); L-Glutamin (Biochrom, 2 mM), Na-Pyruvat (Biochrom, 1 mM),  $\text{NaN}_3$  (Sigma, 0,01%).

Im Falle einer Stimulation der Zellen wurde entweder Phythämagglutinin M (Biochrom, 5  $\mu\text{g/ml}$ ) oder  $\gamma$ -Interferon (100 U/ml) eingesetzt. Die Stimulation der Zellen erfolgte dabei über 1–3 Tage mit Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (Biochrom).

Als Targets für die zu untersuchenden Enzyme wurden frisch isolierte, humane, periphere, mononukleäre Blutzellen (Citratblut) verwendet. Nach der üblichen Isolation mittels Ficoll wurden die Zellen mehrfach gewaschen und frisch bei den Experimenten eingesetzt. Neutrophile Granulozyten wurden ebenfalls aus frischem Citratblut isoliert. Hierbei erfolgte die Abtrennung von den Lymphozyten/Monozyten mittels eines 2-Stufen-Ficoll-Gradienten.

#### 2. Verwendete monoklonale Antikörper

Für die spezifische Erkennung der Oberflächenstrukturen der Leukozyten wurden monoklonale Antikörper verwendet. Diese erkennen auf den entsprechenden Antigenen jeweils ein definiertes Epitop, welches bei den von uns untersuchten Antigenen nur ein einziges Mal in der Struktur vorkommt. In Übersicht 1 sind die untersuchten Oberflächenmarker, die monoklonalen Antikörper sowie die analysierten Targetzellen dargestellt.

#### Übersicht 1

Analysierte Oberflächenmarker, verwendete monoklonale Antikörper und Targetzellen der Enzymbehandlung

Marker	Epitop AK-Bez.	Fluorochrom	Produzent	Target-Zelle
CD2	Leu5b	PE <sup>1</sup>	B.D. <sup>3</sup>	T-Lymphozyten
CD4	Leu3a	PE	B.D.	T-Lymphozyten
	OKT4	FITC <sup>2</sup>	Ortho <sup>4</sup>	T-Lymphozyten
CD11b	Leu15	PE	B.D.	Granulozyten
CD25	IL-2R	PE	B.D.	PHA-Blasten

<sup>1</sup> Phycoerythrin, rote Fluoreszenz;

<sup>2</sup> Fluoreszeinisothiocyanat, grüne Fluoreszenz;

<sup>3</sup> Becton Dickinson, Heidelberg;

<sup>4</sup> Ortho Diagnostics

#### 3. Inkubationsbedingungen

Die frisch isolierten und aufbereiteten Zellen wurden mit den Enzymen Bromelain, Papain und Trypsin (Arzneimittel-Inhaltsstoffe der Fa. Mucos) mit den jeweils in den Legenden der Tabellen und Abbildungen angegebenen Konzentrationen inkubiert. Bei der Mischung der drei Enzyme entsprach das Mischungsverhältnis 22,7 15,5 : 11,9 (Bromelain : Papain : Trypsin, bezogen auf 40  $\mu\text{g/ml}$ , "BPT"). Es wurden drei Enzymkonzentrationen (40, 10, 2,5  $\mu\text{g/ml}$ ) untersucht. Die Inkubation fand in serumfreiem Medium bei 37°C statt.

Die Proteasen wurden unmittelbar vor den Inkubationen angesetzt. In den Zellkulturmedien war 0,01% Natriumazid enthalten. Durch diesen Zusatz werden die Zellen daran gehindert, während des Inkubationsprozesses oder der Waschvorgänge Rezeptormoleküle erneut zu exprimieren. Nach dem Auswaschen des Zellkulturmediums sind die Zellen wieder aktivierbar (nicht demonstriert).

Nach entsprechender Inkubation der Zellen mit den jeweiligen Enzymen, Auswaschen der Enzyme und der Markierung mit monoklonalen Antikörpern (nach Angaben der Hersteller) wurde sofort die Analyse der Oberflächenmarker vorgenommen.

## 4. Analytische Durchflußcytometrie

Alle Untersuchungen zur Modulation von Zelloberflächenmolekülen wurden mittels analytischer Durchflußcytometrie (FACSCAN, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) unter Verwendung einer gerätespezifischen Software (Lysis 1) durchgeführt. Bei entsprechender Einstellung des Gerätes sowie der Mitführung von Referenzen, d. h. Zellen, die ohne Enzyme aber in derselben Prozedur behandelt wurden, erfolgte die Messung.

Für jede Subklasse der monoklonalen Antikörper wurde eine entsprechende fluoreszenzkonjugierte Isotypenkontrolle mitgeführt. Hierbei handelt es sich um Maus-Immunglobulin, mit welchem die Kapazität der unspezifischen Bindung der Targetzellen flußcytometrisch erfaßt wird.

Pro Histogramm wurden 10 000 Zellen gemessen. Die jeweilige Zellpopulation wurde mit einem sogenannten "elektronischen Gate" separiert, in dem sich dann mindestens 3 500 Zellen befanden.

## 5. Darstellung der Ergebnisse

Die Auswertung und Analyse der Daten erfolgte unabhängig vom Meßvorgang auf dem Durchflußcytometer mittels einer gerätespezifischen Software. Dabei wurden jeweils die Histogramme der Kontrollen, d. h. der unbehandelten Zellproben, mit den Histogrammen der enzymbehandelten Zellen verglichen.

Die Rohdarstellung umfaßt ein optisch eindrucksvolles, aber relativ unübersichtliches Histogramm, bei dem verschiedene Einzelmessungen übereinander gelagert abgebildet sind. Hier läßt sich insbesondere die Wirkung der Enzyme im Vergleich zur Referenz optisch transparent machen. Für diese Untersuchungen ist nicht der prozentuale Anteil einer Subpopulation an der gesamten Leukozytenpopulation die Meßgröße, sondern die relative Rezeptordichte, die sich als Fluoreszenzintensität darstellt.

Aus diesen Histogrammen, die beispielhaft sind und illustrativen Charakter haben, lassen sich Daten ableiten, welche die relative Fluoreszenzintensität der Einzelmessung reflektieren. Diese ist ein Maß für die relative Rezeptor- oder Oberflächenmoleküldichte bei einer gemessenen Zellpopulation.

Die Säulengraphiken zeigen in logarithmischer Darstellung den Median der relativen Fluoreszenz. Es läßt sich so gegenüber der Referenz die Reduktion der Dichte des jeweiligen Oberflächenmoleküls in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration darstellen.

In den Tabellen sind die Daten unabhängiger Experimente enthalten. Die Nummern der Spender haben nur für die jeweilige Tabelle Gültigkeit und sind nicht auf andere Tabellen übertragbar. Wird in der Tabelle beispielsweise ein Wert von 40% angegeben, so bedeutet das, daß bei diesem Antigen 40% aller Oberflächenmoleküle durch das Enzym so verändert ist, daß der spezifische monoklonale Antikörper sein Epitop nicht mehr erkennt. Wird keine Reduktion beobachtet, so erscheint in den Tabellen der Wert "0". Die angegebene Prozentzahl drückt somit die Enzymleistung gegenüber den einzelnen Antigenen aus. Werte bis zu 20% werden im Einzelfall als nicht relevant angesehen.

Für eine Bewertung der Wirkung der Enzyme auf die einzelnen Antigene ist es günstig, einen geeigneten Vergleichsmaßstab zu wählen. Bis auf wenige Ausnahmen wurden alle Untersuchungen unter standardisierten Inkubationsbedingungen durchgeführt. Damit kann für diese experimentellen Bedingungen die aus früheren Forschungsberichten bekannte Halbeffektkonzentration angegeben werden.

Zur Berechnung der Halbeffektkonzentration wurden die Daten mittels nicht-linearer Regression ausgewertet. Der Median der Fluoreszenzintensität versus eingesetzter Enzymkonzentration und Referenz werden zueinander in Beziehung gesetzt, und daraus läßt sich die Menge an Enzym berechnen, die zu einer 50%igen Reduktion der relativen Fluoreszenzintensität bzw. der in der Struktur veränderten Rezeptordichte führt.

## Abb. 1

CD2-Modulation durch Proteasen; Angegeben ist der Median der relativen Fluoreszenzintensität; Targetzellen: Lymphozyten. Die Positivkontrolle (Referenz) sind unbehandelte Zellen, die mit dem für CD2 spezifischen monoklonalen Antikörper inkubiert wurden. Die Negativkontrolle sind unbehandelte Zellen, die mit dem Antikörper-Isotyp inkubiert wurden. Die Inkubationszeit mit den Enzymen betrug 60 min. Dargestellt sind die Daten von Spender 1 (vgl. Tab. 1) als Mittelwert von Doppelbestimmungen und Standardabweichung.

## Abb. 2

CD4 (Epitop Leu3a)-Modulation durch Proteasen; Angegeben ist der Median der relativen Fluoreszenzintensität; Targetzellen: Lymphozyten. Die Positivkontrolle (Referenz) sind unbehandelte Zellen, die mit dem für CD4 spezifischen, monoklonalen Antikörper inkubiert wurden. Die Negativkontrolle sind unbehandelte Zellen, die mit dem Antikörper-Isotyp inkubiert wurden. Die Inkubationszeit mit den Enzymen betrug 60 min. Dargestellt sind die Daten von Spender 2 (vgl. Tab. 2) als Mittelwert von Doppelbestimmungen und Standardabweichung.

## Abb. 3

CD4 (Epitope OKT4 und Leu3a)-Modulation durch Trypsin; Angegeben ist der Median der relativen Fluoreszenzintensität; Targetzellen: Lymphozyten. Die Positivkontrolle (Referenz) sind unbehandelte Zellen, die mit dem für CD4 spezifischen monoklonalen Antikörper inkubiert wurden. Die Negativkontrolle sind unbehandelte Zellen, die mit dem Antikörper-Isotyp inkubiert wurden. Die Inkubationszeit mit den Enzymen betrug 60 min. Dargestellt sind die Daten von einem Spender (vgl. Tab. 3) als Mittelwert von Doppelbestimmungen und Standardabweichung.

## Abb. 4

CD11b-Modulation durch Proteasen; Angegeben ist der Median der relativen Fluoreszenzintensität; Targetzellen: Granulozyten. Die Positivkontrolle (Referenz) sind unbehandelte Zellen, die mit dem für CD11b spezifischen monoklonalen Antikörper inkubiert wurden. Die Negativkontrolle sind unbehandelte Zellen, die mit dem Antikörper-Isotyp inkubiert wurden. Die Inkubationszeit mit den Enzymen betrug 60 min. Dargestellt sind die Daten von einem Spender als Mittelwert von Doppelbestimmungen und Standardabweichung.

## Abb. 5

CD25-Modulation durch Proteasen; Angegeben ist der Median der relativen Fluoreszenzintensität; Targetzellen: PHA-Blasten. Die Positivkontrolle (Referenz) sind unbehandelte Zellen, die mit dem für CD25 spezifischen, monoklonalen Antikörper inkubiert wurden. Die Negativkontrolle sind unbehandelte Zellen, die mit dem Antikörper-Isotyp inkubiert wurden. Die Inkubationszeit mit den Enzymen betrug 60 min. Dargestellt sind die Daten von Spender 1 als Mittelwert von Doppelbestimmungen und Standardabweichung.

## Abb. 6

Reduktion der Leu3a-Antigendichte durch Trypsin. Frisch isolierte humane periphere, mononukleäre Blutzellen wurden mit Trypsin im serumfreien Medium inkubiert, anschließend gewaschen und mit dem monoklonalen Antikörper anti-Leu3a markiert. Die Reduktion der relativen Fluoreszenzdichte von CD4 der Lymphozytenpopulation ist das Maß der Enzymaktivität. Die Halbeffektkonzentration von Trypsin gegenüber dem Epitop Leu3a von CD4 wird über die gefittete Kurve berechnet.

## Ergebnisse

## Tabelle 1

CD2-Modulation durch Proteasen; Targetzellen: Lymphozyten. Angegeben ist die prozentuale Reduktion des Medians der relativen Fluoreszenzintensität, die ein Maß der Enzymleistung ist. Die Inkubationszeit mit den Enzymen betrug 60 min. Es sind die Ergebnisse von drei Experimenten mit Zellen von drei verschiedenen Spendern dargestellt.

Enzym	Nr.	40 µg/ml	10 µg/ml	2,5 µg/ml
Bromelain	1	11,1	17,9	17,4
	2	6,1	12,2	14,3
	3	0	0	0
Papain	1	22,4	21,4	34,7
	2	5,4	9,5	17,0
	3	0	0	0
Trypsin	1	75,7	73,6	73,0
	2	83,7	21,1	0,7
	3	96,3	85,4	50,9
BPT	1	71,9	54,7	38,2
	2	74,1	8,8	18,4
	3	94,8	72,6	25,2

## Tabelle 2

CD4(Epitop Leu3a)-Modulation durch Proteasen; Targetzellen: Lymphozyten. Angegeben ist die prozentuale Reduktion des Medians der relativen Fluoreszenzintensität, die ein Maß der Enzymleistung ist. Die Inkubationszeit mit den Enzymen betrug 60 min. Es sind die Ergebnisse von zwei Experimenten mit Zellen von zwei verschiedenen Spendern dargestellt.

Enzym	Nr.	40 µg/ml	10 µg/ml	2,5 µg/ml
5 Bromelain	1	24,6	0	0
	2	16,2	0	0
10 Papain	1	2,5	3,2	0
	2	0	0	5,7
15 Trypsin	1	99,3	93,0	64,1
	2	99,4	96,2	57,5
20 BPT	1	98,3	49,3	23,0
	2	99,4	79,2	20,2

25 Tabelle 3

Modulation der CD4-Epitope Leu3a und OKT4 durch Trypsin; Targetzellen: Lymphozyten. Angegeben ist die prozentuale Reduktion des Medians der relativen Fluoreszenzintensität, die ein Maß der Enzymleistung ist. Die Inkubationszeit mit den Enzymen betrug 60 min. Es sind die Daten von einem Spender dargestellt.

Enzym	Epitop	40 µg/ml	20 µg/ml	10 µg/ml
35 Trypsin	Leu3a	98,5	96,7	87,1
	OKT4	6,5	6,3	19,5
	Epitop	5 µg/ml	2,5 µg/ml	1,25 µg/ml
40 Trypsin	Leu3a	65,2	41,9	28,8
	OKT4	13,3	10,8	9,3

45

Tabelle 4

CD11b-Modulation durch Proteasen; Targetzellen: Granulozyten. Angegeben ist die prozentuale Reduktion des Medians der relativen Fluoreszenzintensität, die ein Maß der Enzymleistung ist. Die Inkubationszeit mit den Enzymen betrug 60 min. Es sind die Ergebnisse von drei Experimenten mit Zellen von drei verschiedenen Spendern dargestellt.

55

60

65

Enzym	Nr.	40 µg/ml	10 µg/ml	2,5 µg/ml	
Bromelain	1	0	0	26,4	5
	2	0	0	n.d.	
	3	13,5	8,1	27,5	10
Papain	1	0	0	0	
	2	0	0	0	
	3	7,9	35,9	20,0	15
Trypsin	1	0	0	n.d.	
	2	17,0	0	0	20
	3	19,0	1,9	13,9	
BPT	1	0	4,3	n.d.	25
	2	0	0	0	
	3	3,1	8,6	4,7	30

Tabelle 5

CD25-Modulation durch Proteasen; Targetzellen: Lymphozyten, Monozyten, NK-Zellen. Angegeben ist die prozentuale Reduktion des Medians der relativen Fluoreszenzintensität, die ein Maß der Enzymleistung ist. Die Inkubationszeit mit den Enzymen betrug 60 min. Es sind die Ergebnisse von zwei Experimenten mit Zellen von zwei verschiedenen Spendern dargestellt. Vor dem Experiment wurden die Zellen 3 Tage mitogenstimuliert.

Enzym	Nr.	40 µg/ml	10 µg/ml	2,5 µg/ml	
Bromelain	1	90,7	80,1	59,7	40
	2	62,6	43,6	0	
Papain	1	92,2	81,0	60,7	45
	2	62,6	43,6	0	
Trypsin	1	91,2	88,2	71,0	50
	2	78,9	73,9	52,8	
BPT	1	92,1	89,7	50,9	55
	2	79,4	44,1	12,2	

Tabelle 6

Berechnete Halbeffektkonzentration (µg/ml) von Bromelain, Papain, Trypsin und deren Kombination für die 50%ige Reduktion der Dichte von zellulären Oberflächenmolekülen. Die Enzyminkubation betrug 1 Stunde.



Enzyme		CD2	CD4 <sup>3</sup>	CD25 <sup>4</sup>
5 Bromelain	Halbeffektkonz. <sup>1</sup>	n w	n w	18,4
	Bereich <sup>2</sup>	-	-	14-23
Papain	Halbeffektkonz. <sup>1</sup>	n w	n w	12,4
	Bereich <sup>2</sup>	-	-	11-14
10 Trypsin	Halbeffektkonz. <sup>1</sup>	1,5	2,5	< 2,5
	Bereich <sup>2</sup>	1-2	2,3-3,1	
15 B-P-T <sup>5</sup>	Halbeffektkonz. <sup>1</sup>	9,3	16,4	16,0
	Bereich <sup>2</sup>	7,5-14	15,5-18	13-19

20 <sup>1</sup> berechnet aus Mittelwerten von 2 oder 3 unabhängigen Experimenten

<sup>2</sup> minimaler und maximaler Wert, 95 % Konfidenzbereich = 1  $\delta$ ,  
25 geschätzt

<sup>3</sup> Modulation von CD4-Epitop Leu3a

<sup>4</sup> auf stimulierten Zellen präsent

30 <sup>5</sup> Mischung der Proteasen im Verhältnis 22,7 : 15,5 : 11,9  
-Bromelain : Papain : Trypsin

n w: nicht wirksam im untersuchten System (max. 40  $\mu$ g Enzym/ml,  
35 1 h Inkubation)

#### Patentansprüche

- 40 1. Verwendung von mindestens einem proteolytischen Enzym und gegebenenfalls mit Rutin zur Behandlung von Glomerulonephritis.
2. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als proteolytisches Enzym Trypsin, Bromelain oder Papain verwendet wird oder eine Kombination zweier oder mehrerer dieser Enzyme.
- 45 3. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich Rutosid verwendet wird.
4. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß 20 bis 100 mg Bromelain, 40 bis 120 mg Papain und 10 bis 50 mg Trypsin pro Dosisseinheit verwendet werden.
- 50 5. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß 90 mg Bromelain, 120 mg Papain und 100 mg Rutosid pro Dosisseinheit verwendet werden.
6. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß 90 mg Bromelain, 48 mg Trypsin und 100 mg Rutosid pro Dosisseinheit verwendet werden.
7. Verwendung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß 10 bis 100 mg, vorzugsweise 10 mg Rutosid $\times$ 3H<sub>2</sub>O pro Dosisseinheit verwendet werden.

55

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

60

65

Abbildung 1

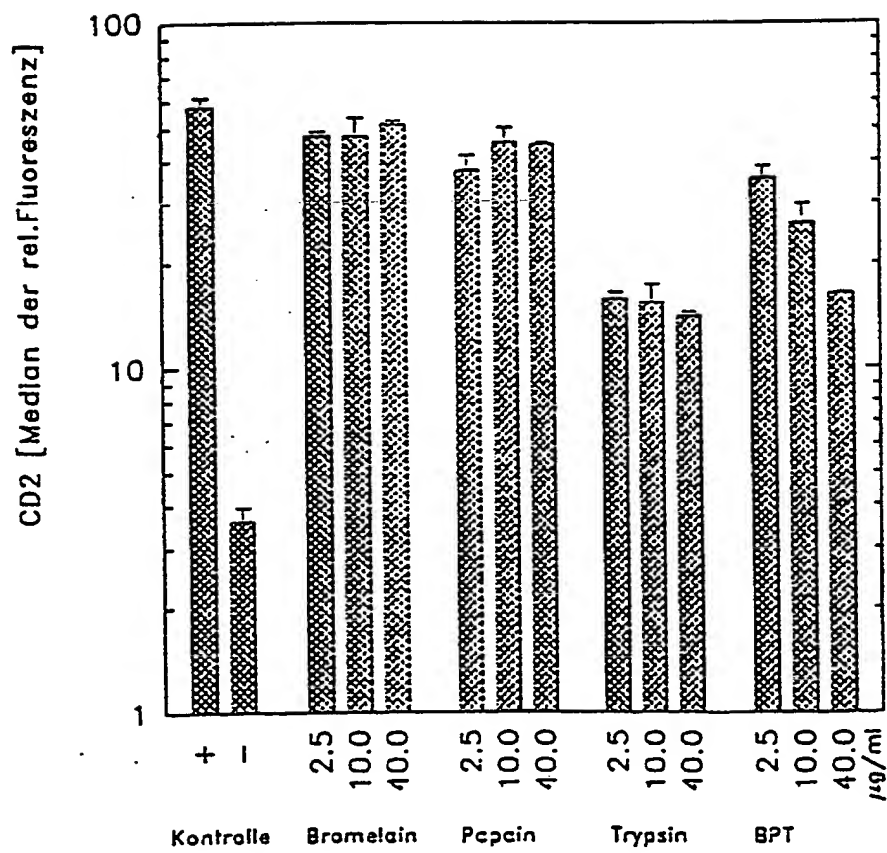


Abbildung 2):

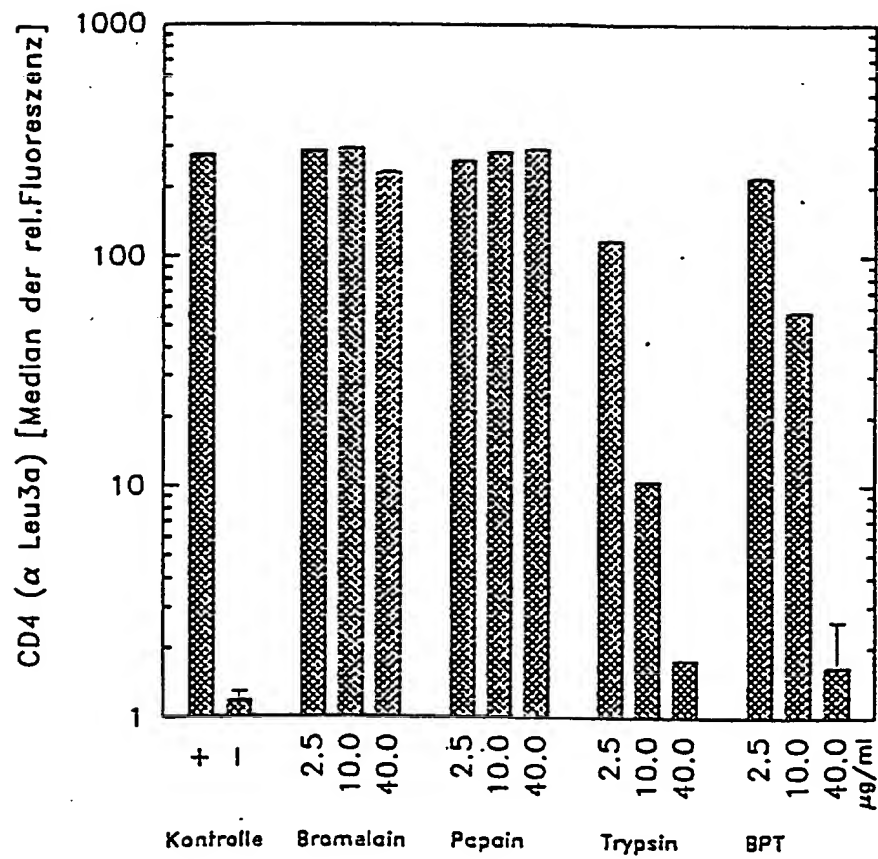


Abbildung 3:

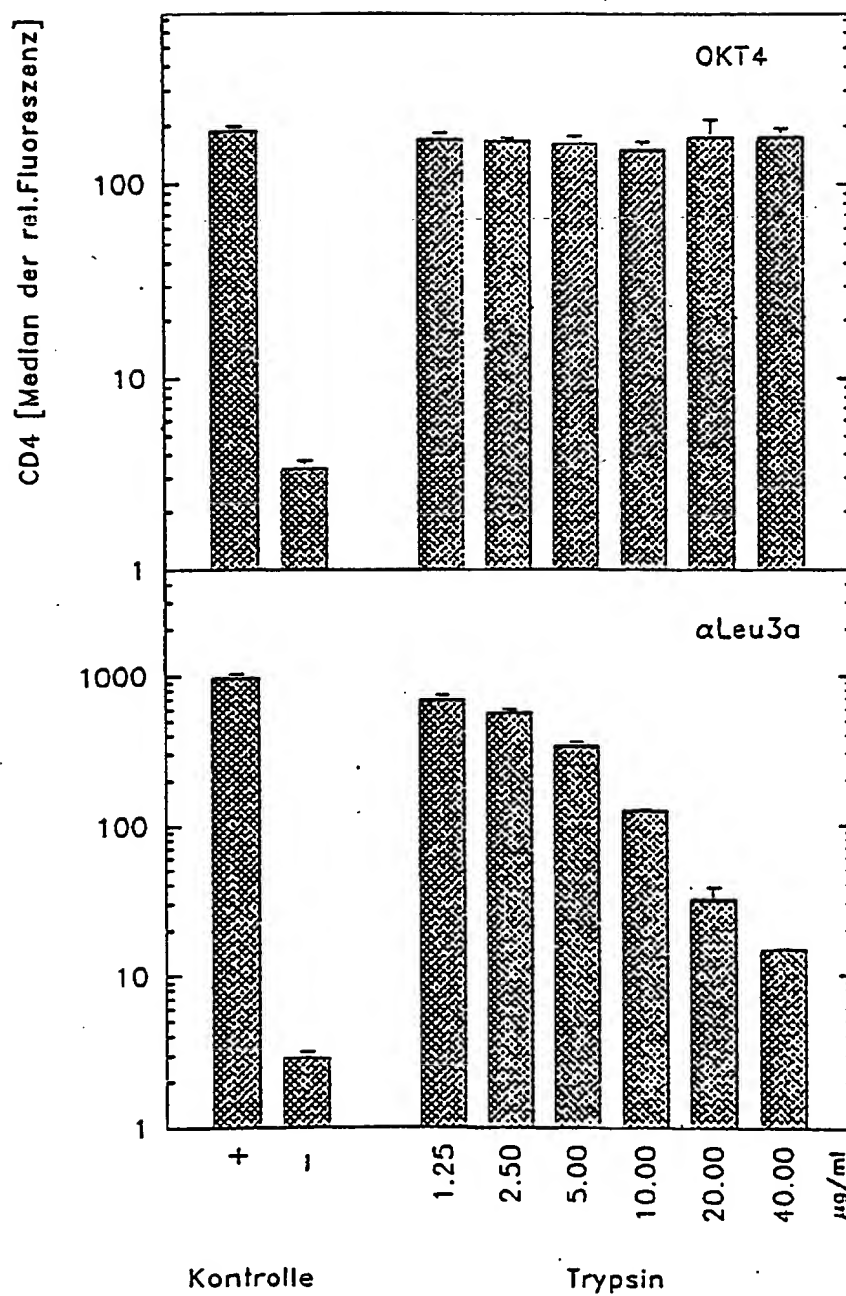


Abbildung 4

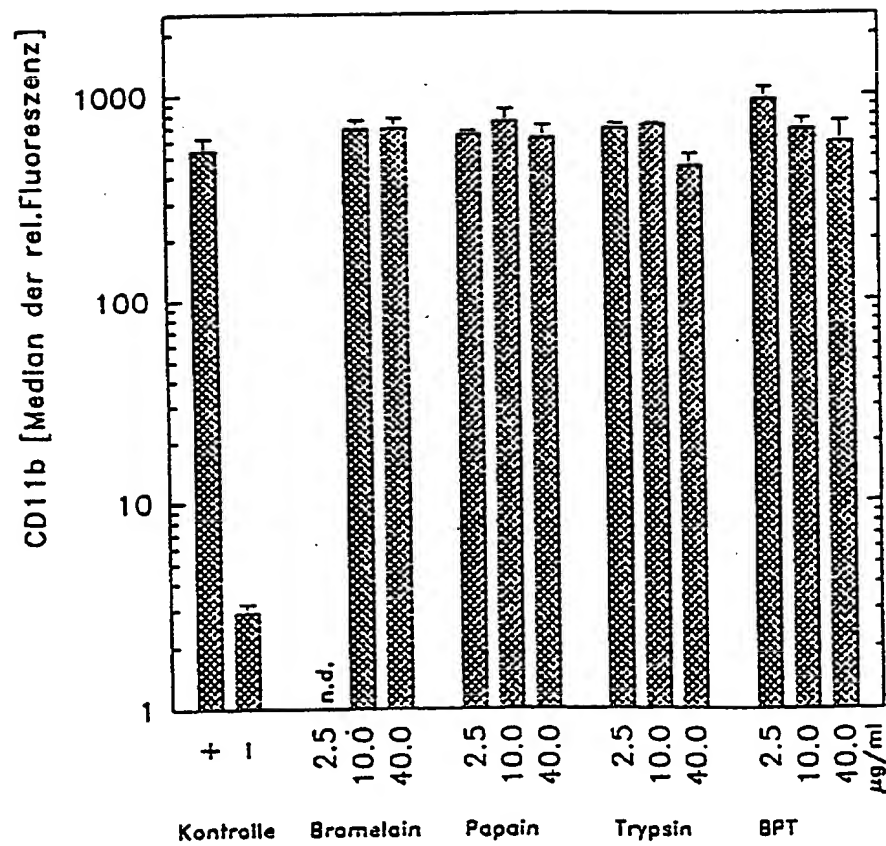


Abbildung 5

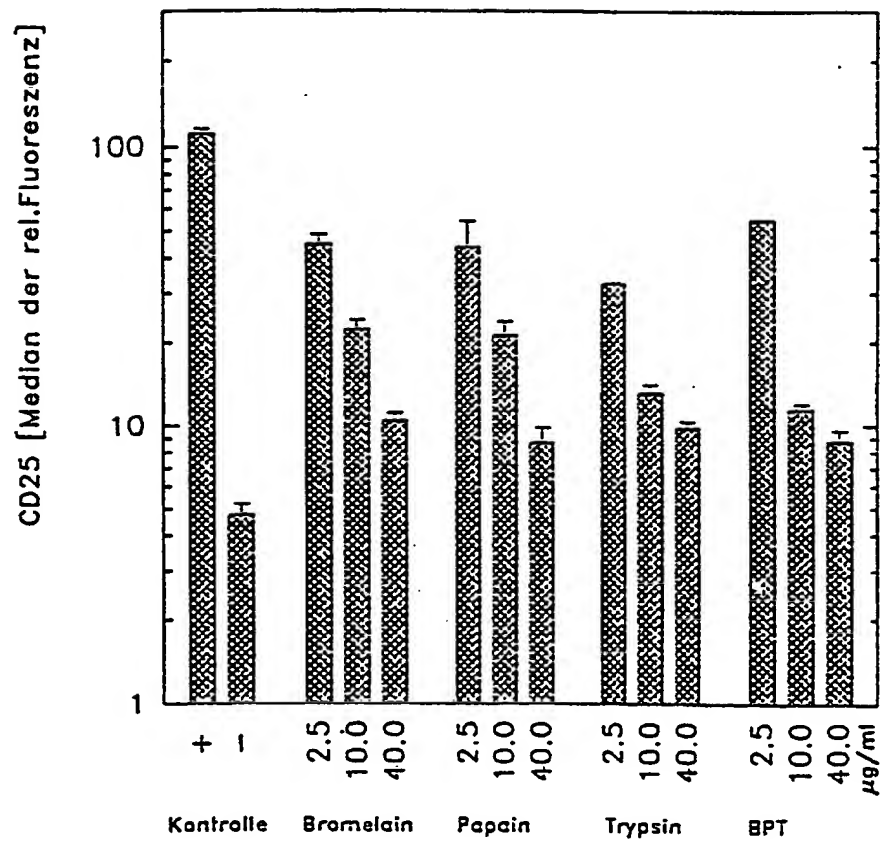


Abbildung 6:

